

# ANGEWANDTE CHEMIE

HERAUSGEGEBEN VON DER GESELLSCHAFT DEUTSCHER CHEMIKER

69. Jahrgang · Nr. 20 · Seite 627–658 · 21. Oktober 1957

FORTSETZUNG DER ZEITSCHRIFT »DIE CHEMIE«

## Photosynthese

Von Prof. Dr. O. WARBURG

Unter Mitarbeit von W. SCHRÖDER, G. KRIPPAHL und H. KLOTZSCH

Max-Planck-Institut für Zellphysiologie, Berlin-Dahlem

Nach einem Plenarvortrag auf der GDCh-Hauptversammlung am 5. Oktober 1957 in Berlin

Die Bedingungen, von denen die fast vollkommene Ausnutzung der Lichtenergie bei der Photosynthese abhängt sowie das Zusammenspiel von Lichtenergie und Atmungsenergie und damit Lösung des Quantenproblems der Photosynthese werden beschrieben. Chlorophyll ist als stöchiometrisch-chemischer Reaktionsteilnehmer an der Photosynthese beteiligt. Die Entdeckung der labilen Kohlensäure und damit des Zerfalls und Wiederaufbaus der Glutaminsäure in lebender Chlorella wird beschrieben; Aminosäuren oder deren Carbamino-Derivate spielen bei der Bindung und Reduktion der Kohlensäure eine Rolle.

Seit *Chlorella* das Versuchsobjekt der Photosynthese ist, weiß man, daß es Zellen gibt, die das Licht gut ausnutzen, und Zellen, die das Licht schlecht ausnutzen. Wir haben uns in der letzten Zeit bemüht, die Bedingungen zu finden und festzulegen, unter denen die gut ausnutzenden Zellen entstehen. Es hat sich dabei gezeigt, daß eine der wichtigsten Bedingungen die Lichtintensität ist, bei der man die Zellen züchtet. Läßt man die künstlichen Lichtquellen, wie man es bisher fast überall getan hat, ununterbrochen mit der gleichen Helligkeit brennen, so entfernt man sich zu weit von den natürlichen Lebensbedingungen, unter denen *Chlorella* seit 500 Millionen Jahren wächst. Man zwingt dabei die Zellen, ununterbrochen organische Substanz zu produzieren, und mehr Substanz, als sie zu ihrem Aufbau brauchen. Die Gegenmaßnahme ist, daß die Zellen die Energieausbeuten auf einen kleinen Bruchteil der optimalen Ausbeuten vermindern.

Zellen, die das Licht gut ausnutzen, entstehen dagegen<sup>1)</sup>, wenn man die Intensität des Lichts so fluktuieren läßt, daß Tag und Nacht, Morgen- und Abenddämmerung nachgeahmt werden. Wir erreichen dies, indem wir die Betriebsspannung einer Metallfadenlampe in 24 Stunden automatisch von 50 auf 220 Volt steigen und wieder auf 50 Volt abfallen lassen. Die dabei ausgestrahlten relativen Quanten-Intensitäten sind mit dem chemischen Quantenactinometer gemessen und als Ordinaten in Bild 1 eingetragen worden.

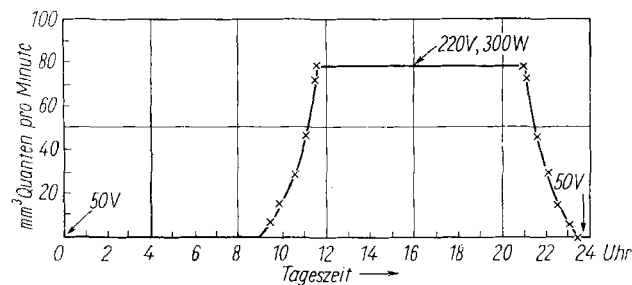


Bild 1

Fluktuierende Lichtintensität bei der Kultur der *Chlorella*

<sup>1)</sup> O. Warburg, W. Schröder u. H. Gattung, Z. Naturforsch. 11b, 654 [1956].

Die so gezüchteten Zellen nutzen das Licht am besten aus, wenn sie morgens in die Meßgefäße gebracht werden, und ihre Energieausbeute dann während des künstlichen Tages gemessen wird.

Ebenso wichtig wie die Zucht der Zellen sind die Bedingungen, unter denen die Ausnutzung des Lichts gemessen wird. Auch hierfür ein Beispiel. Bei Messungen mit monochromatischem Licht wurde gefunden, daß die Ausnutzung des Lichts im Grün oder Gelb oder Rot um so schlechter war, je reiner die Spektralbezirke waren. Die Ausnutzung wurde aber sofort gut, wenn dem monochromatischen

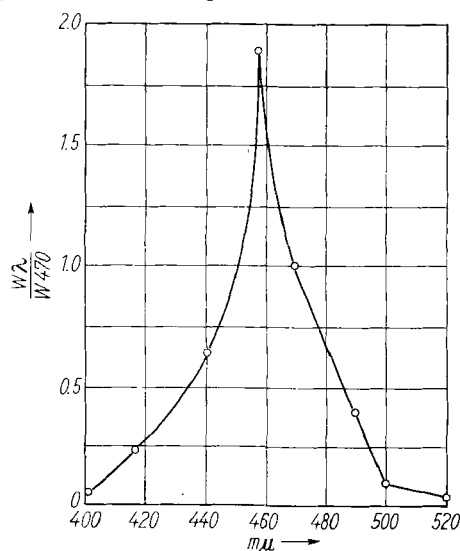


Bild 2

Wirkungsspektrum des blaugrünen Lichts

Meßlicht eine kleine Menge blaugrünes Licht hinzugefügt wurde. So kann man die guten oder die schlechten Ausbeuten nach Wunsch erzeugen, einfach indem man bei der Messung abwechselnd blaugrünes Licht hinzufügt oder fortnimmt. Beträgt die Periode dabei 30 Minuten, so erhält man während eines 8stündigen Arbeitstages, mit ein- und derselben Zellsuspension, 8 mal gute und 8 mal schlechte Ausbeuten.

Die verschiedenen Spektralbezirke des Blaugrün sind dabei nicht gleichwertig. Bestimmt man ihre relative Wirk-samkeit, so erhält man das Wirkungsspektrum<sup>2)</sup> des blau-grünen Lichts, das in der Nähe von 460 m $\mu$  ein scharfes Maximum hat (Bild 2).

Wahrscheinlich ist dieses Wirkungsspektrum ein Carotinoid-Spektrum. Wahrscheinlich wird durch das blau-grüne Licht ein unwirksames Carotinoid-Proenzym in ein wirksames Luminoenzym umgewandelt. Als Analogon sei der lichtempfindliche Sehpurpur angeführt oder das Ooverdin, ein von Richard Kuhn entdecktes Carotinoid-Proteid.

Unsere beiden Beispiele — das fluktuierende Licht bei der Zucht und das blaugrüne Licht bei der Messung — werden genügen, um es verständlich zu machen, warum in den letzten 40 Jahren in verschiedenen Instituten der Welt so verschiedene Ausbeuten bei der Photosynthese gefunden worden sind, verschieden nicht nach Prozents, sondern verschieden nach Hunderten von Prozents. Selbst wenn die Manometrie und die Lichtmessung überall korrekt gewesen wäre, so wäre bei Unkenntnis der wesentlichen Zucht- und Meßbedingungen eine auch nur annähernde Übereinstimmung nicht möglich gewesen. So wurde in den Kriegsjahren in den Vereinigten Staaten ein mittlerer Quantenbedarf von 16 pro Molekel Sauerstoff gefunden, das entspricht einem Energiegewinn von 18% im Rot; das ist ein Wert, der um mehrere hundert Prozent von dem optimalen Wert entfernt ist (vgl.<sup>1)</sup>).

Hält man aber die für gute Ausbeuten nunmehr festgelegten Bedingungen ein, so wird man von nun an überall und immer gute Ausbeuten erhalten. Bild 3 zeigt die

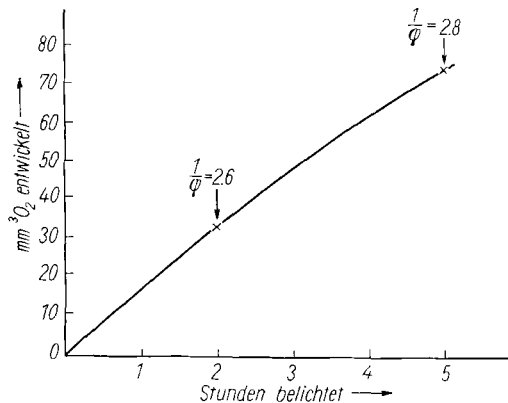


Bild 3. Sauerstoff-Entwicklung bei konstanter Belichtung mit grün + blaugrün (fünftündiger Versuch)

Sauerstoff-Entwicklung bei konstanter Belichtung in einem fünfstündigen Versuch, bei dem der Quantenbedarf pro Molekel Sauerstoff für die ganze Zeit ungefähr 3 war. Die Abweichungen von der graden Linie sind die Fehler der Messungen. Bild 4 zeigt die Sauerstoff-Entwicklung in einem sechsstündigen Versuch, bei dem der Quantenbedarf pro Molekel Sauerstoff ungefähr 4 war. Tabelle 1 enthält das Ergebnis von 23 sechsstündigen Versuchen, ausgeführt an 23 Tagen der Monate März und April dieses Jahres, in denen nur ein einziges Mal eine schlechte Ausbeute, nämlich die Quantenzahl 7,5, erhalten wurde<sup>3)</sup>.

Der Quantenbedarf 3 pro Molekel Sauerstoff bedeutet, daß im Rot etwa 90% der eingestrahnten Lichtenergie in chemische Energie verwandelt werden kann. Da Lichtenergie freiverwandbare Energie ist, so ist diese Energieausnutzung durchaus mit den Energiegesetzen vereinbar.

<sup>2)</sup> O. Warburg, G. Krippahl u. W. Schröder, ebenda 10b, 631 [1955].  
<sup>3)</sup> O. Warburg, W. Schröder u. H. Gattung, Z. Naturforsch. 12b, Novemberheft [1957].

Thermodynamisch unvereinbar mit guten Ausbeuten waren lediglich Theorien über den chemischen Mechanismus der Photosynthese, die heute längst als unrichtig erkannt sind.

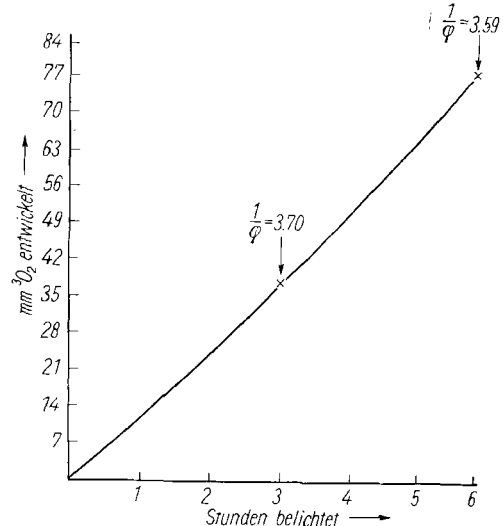


Bild 4. Sauerstoff-Entwicklung bei konstanter Belichtung mit grün + blaugrün (sechsstündiger Versuch)

Datum	Quantenbedarf	Datum	Quantenbedarf
1. 3.	4,10	3. 4.	4,75
3. 3.	3,68	9. 4.	4,26
5. 3.	3,65	10. 4.	4,65
6. 3.	3,58	11. 4.	4,30
7. 3.	4,30	15. 4.	7,51*
14. 3.	3,65	17. 4.	3,92
21. 3.	4,10	23. 4.	3,54
22. 3.	3,22	24. 4.	2,92
25. 3.	4,61	25. 4.	3,20
27. 3.	3,90	26. 4.	4,62
29. 3.	3,56	2. 5.	3,90
1. 4.	3,49		

Tabelle 1  
Quantenbedarf  $\frac{\text{(Mole Quanten, von Chlorophyll absorbiert)}}{\text{(Mole Sauerstoff, entwickelt)}}$

Zusammenfassend kann man sagen, daß durch die Festlegung der Zucht- und Meßbedingungen der Streit um die Ausnutzung des Sonnenlichts endgültig entschieden ist. Es ist eine Entscheidung zugunsten der Natur. Die Reaktion, in der die Natur die Energie des Sonnenlichts in chemische Energie verwandelt und auf der die Existenz der organischen Welt beruht, ist nicht so unvollkommen, daß der größte Teil der aufgewandten Energie dabei verloren geht; sondern die Reaktion ist, so wie die Welt selbst, fast vollkommen.

### Mehrquanten-Problem

Aber wie ist es möglich, daß die Kohlensäure durch die Lichtquanten des sichtbaren Lichts gespalten wird, die so energiearm sind, daß mehrere Quanten zur Spaltung erforderlich sind? Die Photochemie des Unbelehten kennt keine Reaktionen, in denen mehrere Quanten mit einer Molekel reagieren, und auch theoretisch sind Mehrquanten-Reaktionen nicht vorstellbar.

Die hier gestellte Frage ist von Dean Burk und uns<sup>4)</sup> vor einigen Jahren in Dahlem beantwortet worden. Bei Messungen der Photosynthese unter besonderen Bedingungen wurde eine Spaltung der Photosynthese in zwei Reaktionen beobachtet, in eine Lichtreaktion und eine Dunkel-

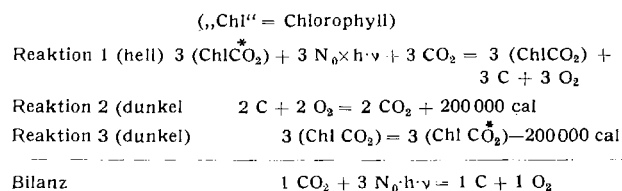
<sup>4)</sup> D. Burk u. O. Warburg, Z. Naturforsch. 6b, 12 [1951].

reaktion. Normalerweise überlagern sich diese beiden Reaktionen, so daß man keine von ihnen einzeln beobachten kann.

In der Lichtreaktion wird pro Molekel Chlorophyll eine Molekel Sauerstoff entwickelt, aber nicht mit dem Quantenbedarf 3, sondern mit dem Quantenbedarf 1, was zunächst den Energiegesetzen zu widersprechen schien. Wurde aber nach Beendigung der Lichtreaktion verdunkelt, so wurde am Manometer beobachtet, wie  $\frac{2}{3}$  des im Licht entwickelten Sauerstoffs wieder zurückreagierte. Dann war der Ausgangszustand wieder hergestellt, und das Licht konnte von neuem Sauerstoff entwickeln<sup>5)</sup>. Wurde also nicht die Lichtreaktion gesondert betrachtet, sondern zusammen mit der Dunkelreaktion, so war energetisch alles in Ordnung.

Die nähere Untersuchung hat gezeigt, daß in der Dunkelreaktion mit Hilfe der Energie der Atmung, der Sauerstoff der Kohlensäure soweit gelockert wird, daß dann ein Lichtquantum ausreicht, um eine Molekel Sauerstoff zu entwickeln. Wahrscheinlich ist das Kohlensäure-Derivat mit dem aufgelockerten Sauerstoff ein Peroxyd. Wir wollen es, um nicht über die Tatsachen hinauszugehen, den „Photolyten“ der Photosynthese nennen.

Schreiben wir die Licht- und Dunkelreaktionen der Photosynthese untereinander, so erhalten wir:



Der Photolyt ist als Derivat der Kohlensäure mit einem Stern versehen, um ihn von der nicht umgelagerten Kohlensäure zu unterscheiden. Nichts in dieser Reaktionsfolge ist Theorie, alles ist experimentell gefunden und in lebender *Chlorella* gemessen. Reaktion 1, die Lichtreaktion, ist durch die Sauerstoff-Entwicklung und den Kohlendioxyd-Verbrauch im Licht gemessen. Reaktion 2 ist durch den Sauerstoff-Verbrauch und die CO<sub>2</sub>-Entwicklung im Dunkeln gemessen. Reaktion 3, in der die gebundene inaktive Kohlensäure in den Photolyten umgewandelt wird, ist durch die Zeit gemessen, die es dauert, bis das Licht wieder ebenso viel Sauerstoff entwickeln kann, wie zu Beginn der Lichtreaktion. Bei unserer Versuchsanordnung dauert dieser Wiederanstieg der Lichtempfindlichkeit etwa 20 Minuten und kann also in seinem zeitlichen Verlauf sehr genau verfolgt werden.

Der Photolyt ist als Chlorophyll-Verbindung geschrieben, weil die Sauerstoff-Menge, die das Licht aus dem Photolyten entwickeln kann, äquivalent dem Chlorophyll-Gehalt der Zellen ist<sup>6)</sup>. Dies ist wichtig. Wir haben nun nicht mehr nötig, darüber nachzudenken, wie es möglich ist, daß die Lichtenergie ohne Verlust von der Chlorophyll-Molekel auf die Photolyt-Molekel übertragen wird, wissen wir doch nunmehr, daß das Licht innerhalb derselben Molekel wirkt, in der es absorbiert wird. Die Lichtreaktion der Photosynthese ist also nichts anderes als die Photodissoziation eines Pigments, vergleichbar der Photodissoziation der Kohlenoxyd-Haemin-Verbindungen, und die Quantenausbeute 1 ist fast selbstverständlich.

<sup>5)</sup> O. Warburg, G. Krippahl, W. Schröder u. W. Buchholz, ebenda 9b, 769 [1954].

<sup>6)</sup> O. Warburg u. G. Krippahl, Svensk Kemisk Tidskrift 69, 143 [1957].

Addiert man die drei Gleichungen der Reaktionsfolgen, so hebt sich der Photolyt heraus, und das Ergebnis ist die Spaltung der Kohlensäure durch drei Lichtquanten, also das, was man bei normaler ungespaltener Photosynthese experimentell findet.

Nichts scheint einfacher zu sein als diese Lösung des Quantenproblems. Von den 110000 cal., die zur Spaltung von 1 Mol Kohlensäure erforderlich sind, liefert ein Atmungsvorgang 70000 cal. Die restlichen 40000 cal., die das Licht dann noch aufzubringen hat, sind gerade soviel, wie die Energie von 1 Mol Quanten im Rot beträgt. Alle Quantenschwierigkeiten sind damit beseitigt.

Um diese Lösung zu würdigen, muß man bedenken, daß bei der Photosynthese keine Energie gewonnen, sondern Energie verloren würde, wenn die Energie des Atmungsvorgangs aus dem Energievorrat der Zelle entnommen würde. Nur dadurch, daß diese Energie in der Lichtreaktion produziert wird, erhält das ganze seinen Sinn. Alles Einzelne ist einfache Physik und Chemie. Aber das Ganze ist eine höhere Art von Physik und Chemie, ersonnen von dem Genius der lebenden Natur.

Zum Abschluß der Energetik möchte ich einen Versuch beschreiben, den man allen Studenten der Biochemie zeigen sollte, weil er in einfachster Weise die Forderung unserer Gleichungen bestätigt, daß es Photosynthese ohne Atmung nicht gibt.

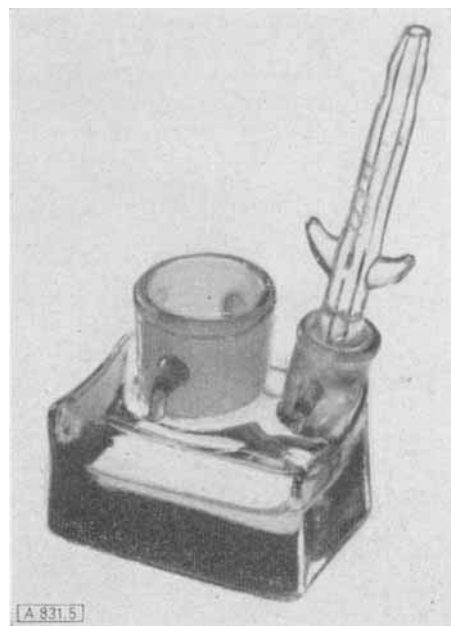


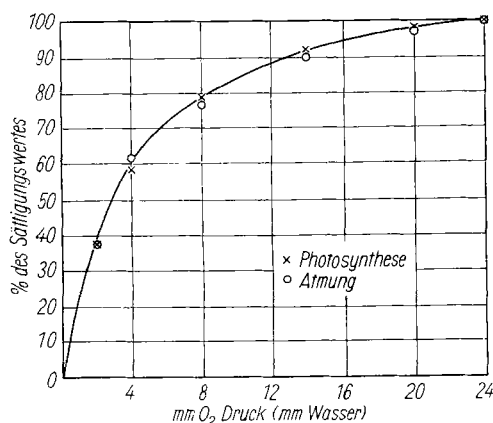
Bild 5  
Gefäß zur Demonstration der Notwendigkeit  
der Atmung

In Bild 5 ist das Versuchsgefäß abgebildet, das man sich mit einem Manometer verbunden denke. Es enthält *Chlorella*, suspendiert in einem Carbonat-Bicarbonat-Gemisch, das den Kohlensäure-Druck konstant hält, so daß Druckänderungen, die das Manometer anzeigt, nur Änderungen des Sauerstoff-Drucks sein können. Der Gasraum enthält Argon und wenig Sauerstoff.

Das Wesentliche unserer Versuchsanordnung ist, daß wir die Zellen selbst dazu benutzen, um die gewünschten niedrigen Sauerstoff-Drucke in unseren Gefäßen zu erzeugen. Verdunkeln wir die Zellen, so sinkt alsbald der Sauerstoff-Druck infolge der Atmung; und belichten wir die Zellen, so steigt alsbald der Sauerstoff-Druck infolge der Photosynthese, ein Spiel, das man beliebig oft wiederholen

kann, ohne das Gefäß zu öffnen. Dabei zeigt uns das Manometer zu jeder Zeit den herrschenden Sauerstoff-Druck an; und die Änderung des Manometerstandes zeigt zu jeder Zeit die zu dem Druck gehörende Atmung oder Photosynthese. So erfahren wir, ob oder in welcher Weise Atmung oder Photosynthese sich mit dem Sauerstoff-Druck ändern.

Das Ergebnis ist in Bild 6 graphisch dargestellt, in der die Änderungen von Atmung und Photosynthese gegen den Sauerstoff-Druck aufgetragen sind. Wie man sieht, ändern sich Atmung und Photosynthese mit dem Sauerstoff-Druck und zwar gleichviel. Ein Sauerstoff-Druck von 3 mm Wasser ist für beide Vorgänge der Halbwertsdruck, ein Sauerstoff-Druck von etwa 20 mm Wasser ist für beide Vorgänge der Ganzwerts-Druck. Unterhalb eines Sauerstoff-Druckes von 1 mm Wasser sind weder Atmung noch Photosynthese nachweisbar.



[A 831.6]

Bild 6

Atmung und Photosynthese bei niedrigen Sauerstoff-Drucken

Der Versuch zeigt viel mehr, als daß Sauerstoff für die Photosynthese notwendig ist. Er zeigt, daß nicht Spuren von Sauerstoff notwendig sind, sondern bestimmte und gut meßbare Drucke an Sauerstoff; und daß diese Drucke deshalb notwendig sind, weil sie für die Atmung notwendig sind. Alles ist genau so, wie es unsere Gleichungen verlangen. Ohne Atmung keine Photosynthese.

### Chemie der Photosynthese

Wir verlassen damit die Energetik und wenden uns der Chemie der Photosynthese zu. Die Fragestellungen sind hier durch die Ergebnisse der Energetik klar vorgezeichnet. Was geschieht in der Dunkelreaktion der Photosynthese chemisch mit der Kohlensäure? Oder anders ausgedrückt: was ist der Photolyt chemisch? Durch den folgenden Versuch<sup>7)</sup> sind die Tore zu diesem Gebiet geöffnet worden.

Der Hauptraum eines kegelförmigen Manometriegefäßes (Bild 7) enthält eine Suspension von *Chlorella*, die Birne enthält Fluorid, der Gasraum Argon, das frei von Kohlensäure und von Sauerstoff sein soll.  $p_H$  im Hauptraum und in der Birne ist 3,8. Gibt man das Fluorid aus der Birne in den Hauptraum, so tritt eine stürmische Entwicklung von CO<sub>2</sub> aus den Zellen ein. Aus 100 mm<sup>3</sup> *Chlorella* werden dabei in wenigen Minuten 30 bis 40 mm<sup>3</sup> CO<sub>2</sub> entwickelt. Der Gehalt der *Chlorella* an dieser labilen Kohlensäure ist also sehr groß, größer zum Beispiel als der Gehalt der roten Blutzellen an Oxy-haemoglobin-Sauerstoff. Eine Spur Blausäure verhindert die Entwicklung der Kohlensäure, woraus hervorgeht, daß es eine Enzymreaktion ist, die bei Zusatz des Fluorids in Gang gesetzt wird.

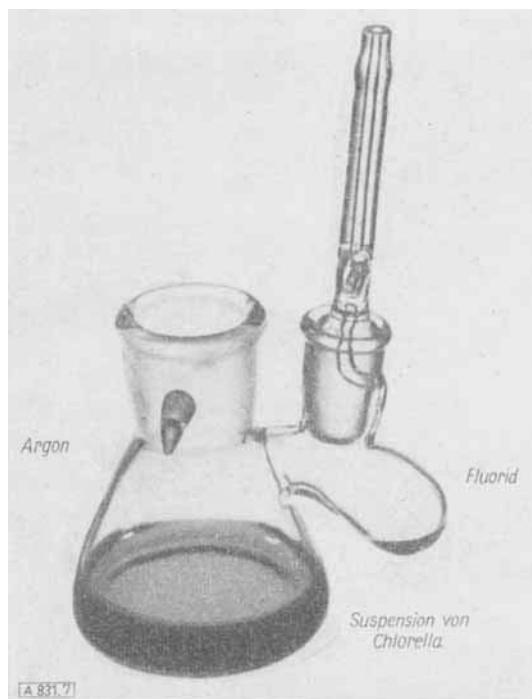


Bild 7

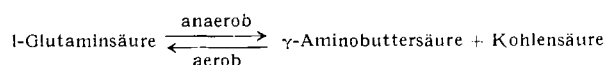
Gefäß zur Messung der labilen Kohlensäure

Zwei Tatsachen sind es, die die Fluorid-Reaktion besonders interessant erscheinen lassen. Treibt man die labile Kohlensäure anaerob mit n/1000 Fluorid aus und leitet dann Sauerstoff durch die Zellsuspension, so wird die ausgetriebene Kohlensäure größtenteils wieder gebunden. Dabei steigt die Atmung, deren Energie zur Wiederbindung der Kohlensäure erforderlich ist. Offenbar ist hier die Analogie zur Dunkelreaktion der Photosynthese sehr weitgehend.

Und zweitens und ebenso wichtig: Entwickelt man die labile Kohlensäure aus *Chlorella* mit kleinen Fluorid-Konzentrationen und belichtet dann, so ist die Photosynthese gehemmt; und wäscht man das Fluorid wieder fort und wartet, bis die Kohlensäure aerob wieder gebunden ist, so ist auch die Photosynthese wieder da. Labile Kohlensäure und Photosynthese hängen also zusammen.

Wir haben daraufhin keine Mühe gescheut, herauszubekommen, welches die Quelle der labilen Kohlensäure ist. Wir fanden, daß es L-Glutaminsäure<sup>8)</sup> ist, von der *Chlorella*, in lockerer Bindung, 0,5 bis 1% ihres Trockengewichts enthält. Diese Glutaminsäure geht in die Außenflüssigkeit über, wenn man eine *Chlorella*-Suspension einige Minuten auf 90 °C erhitzt. Wurde nun in der Außenflüssigkeit des Hitzeextrakts die Glutaminsäure vor Zusatz und nach Zusatz des Fluorids bestimmt, so zeigte sich, daß ebensoviele Glutaminsäure verschwunden war als das Fluorid Kohlensäure entwickelt hatte.

Neben der Kohlensäure entsteht bei der Fluorid-Reaktion  $\gamma$ -Aminobuttersäure. Aerob reagieren  $\gamma$ -Aminobuttersäure und Kohlensäure zu Glutaminsäure zurück, so daß sich aerob ein stationärer Zustand einstellt zwischen Zerfall und Wiederaufbau der Glutaminsäure:



<sup>8)</sup> O. Warburg, H. Klotzsch u. G. Krippahl, *Naturwissenschaften* 44, 235 [1957]; Dieselben, *Z. Naturforsch.* 12b, 266 [1957]; 12b, Oktoberheft [1957].

<sup>7)</sup> O. Warburg u. G. Krippahl, *Z. Naturforsch.* 11b, 718 [1956].

Die  $\alpha$ -Decarboxylierung der Glutaminsäure ist 1910 von Ackermann in Bakterien, 1937 von dem Japaner Okonuki in grünen Pflanzenzellen entdeckt worden. Beide Reaktionen, den Zerfall und den Wiederaufbau der Glutaminsäure, kann man demonstrieren, indem man Hitzeextrakte von *Chlorella* auf Papier aufträgt, in Phenol-Citrat aufsteigen läßt und mit Ninhydrin besprüht.

Als Testsubstanzen der Chromatogramme haben wir Asparaginsäure, Glutaminsäure, Alanin und  $\gamma$ -Aminobuttersäure aufgetragen. Bild 8 zeigt, daß *Chlorella* unter ihren normalen Lebensbedingungen wenig Asparaginsäure, viel Glutaminsäure, noch mehr Alanin und keine Aminobuttersäure enthält.

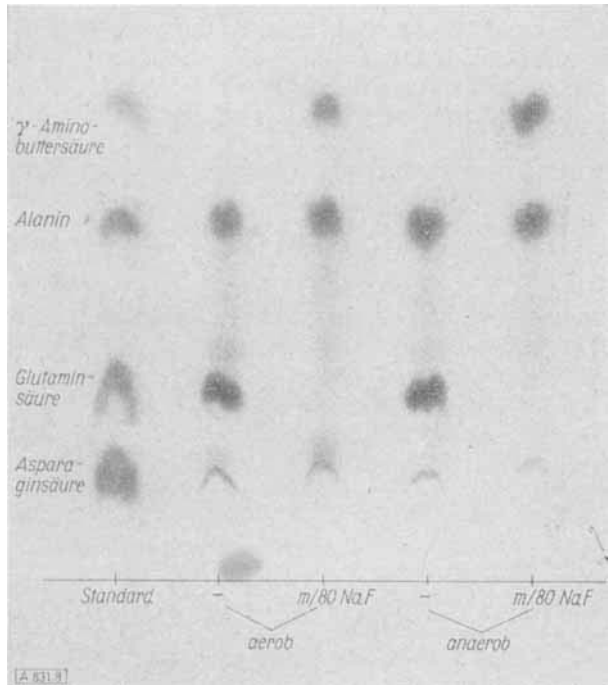


Bild 8  
Wirkung von n/80-Fluorid. Kein Unterschied zwischen aerob und anaerob (Phenol-Citrat-Phosphat; Whatman Nr. 1)



Bild 9  
Wirkung von n/1000-Fluorid. Großer Unterschied zwischen aerob und anaerob (Phenol-Citrat-Phosphat; Whatman Nr. 1)

säure enthält. Von der Glutaminsäure nehmen wir an, daß sie mit dem Chlorophyll verbunden ist, da normal gezüchtete Zellen 1 bis 2 Molekeln Glutaminsäure pro Molekel Chlorophyll enthalten. In n/80 Fluorid verschwindet die Glutaminsäure, und es erscheint  $\gamma$ -Aminobuttersäure. Anaerob und aerob findet man das gleiche, da bei der hohen Fluorid-Konzentration keine Glutaminsäure aerob wieder aufgebaut wird.

In dem Versuch des Bildes 9 war die Fluorid-Konzentration nur n/1000, und hier sieht man anaerob und aerob einen großen Unterschied. Anaerob ist der Zerfall sehr weitgehend, aerob ist nur wenig Glutaminsäure zerfallen. Je mehr Glutaminsäure zersetzt ist, umso mehr ist die Photosynthese gehemmt. Zum Beispiel wurden zu einer *Chlorella*-Suspension aerob zwei verschiedene Fluorid-Konzentrationen gegeben, nach Einstellung des stationären Zustands wurden die Glutaminsäure und die Photosynthese gemessen. Tabelle 2 zeigt, wie nahe Zerfall der Glutaminsäure und Hemmung der Photosynthese übereinstimmen.

Fluorid-Konz.	Zerfall der Glutaminsäure	Hemmung der Photosynthese
n/640	21 %	18 %
n/320	64 %	64 %

Tabelle 2

Bei der Fortsetzung dieser Versuche ist eine weitere Beziehung zwischen Glutaminsäure und Kohlensäure gefunden worden. Untersucht man die Bindung der Kohlensäure durch *Chlorella* bei verschiedenen Kohlensäure-Drucken, so zeigt sich, daß Kohlensäure nicht nur fest, als  $\alpha$ -Carboxyl der Glutaminsäure, gebunden wird, sondern daß (aerob) ebensoviel Kohlensäure außerdem dissoziierend gebunden werden kann. Diese dissoziierende Kohlensäure wird wieder abgegeben, wenn man die Glutaminsäure in den lebenden Zellen zersetzt; und der Sättigungswert der dissoziierenden Kohlensäure ist sehr nahe gleich dem Glutaminsäure-Gehalt der *Chlorella*. Wahrscheinlich handelt es sich hier um die Bildung von Carbamino-Glutaminsäure.

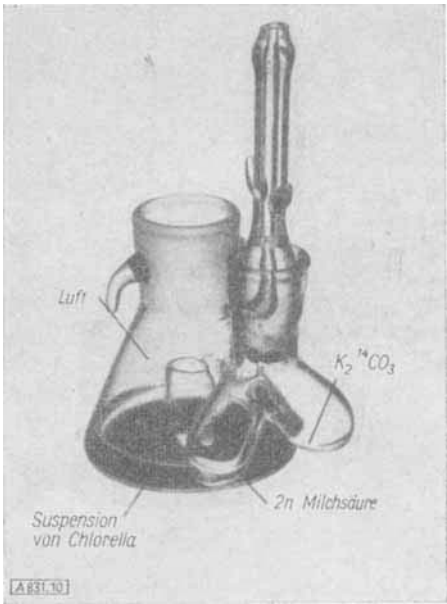


Bild 10  
Manometriegefäß für Versuche mit radioaktiver Kohlensäure

Zum Schluß erwähne ich noch, daß wir begonnen haben, das Verhalten der Aminosäuren bei der Photosynthese mit Hilfe radioaktiver Kohlensäure zu untersuchen. Der Hauptraum eines Manometriegefäßes (Bild 10) enthielt

eine Suspension von *Chlorella*, die zweigeteilte Birne enthielt in dem einen Teil  $^{14}\text{C}$ -Carbonat, in dem andern Teil überschüssige Milchsäure. Wurde die Säure in das Carbonat gegeben, so entstand in dem Gefäß ein Druck von radioaktiver Kohlensäure.

Derartig vorbereitete Gefäße wurden  $\frac{1}{2}$  Minute oder 1 Minute oder 5 Minuten belichtet und dann mit ihren Dunkelkontrollen in heißes Wasser getaucht, um alle Enzymreaktionen zu stoppen und gleichzeitig die gelösten Stoffe aus der *Chlorella* zu extrahieren. Die Hitzeextrakte wurden dann zweidimensional chromatographiert und mit dem Geigerzähler gemessen.

Aus der Tabelle 3 geht erstens hervor, daß die Aminosäuren schnell radioaktiv werden und zwar schneller, als die phosphorylierte Glycerinsäure, der man bisher die zeitliche Priorität bei derartigen Versuchen zugesprochen hat. Zweitens geht aus der Tabelle hervor, daß Asparaginsäure und Alanin schneller radioaktiv werden, als Glutaminsäure, so daß man daran denken kann, daß ein System Alanin-Asparaginsäure dem Glutaminsäure-System vorgeschaltet ist. Allerdings haben sich dafür bisher manometrisch keine Anzeichen ergeben und so muß man abwarten, bis die Radiometrie, durch Verbindung mit Manometrie und Bolometrie, soweit quantitativ entwickelt worden ist, daß man etwas sicheres schließen kann. Die Radiometrie alleine hat schon mehrfach irre geführt.

Aminosäuren	dunkel	hell	dunkel	hell	dunkel	hell
	10' d 0,5' d	10' d 0,5' h	5' d 1' d	5' d 1' h	5' d 5' d	5' d 5' h
Asparaginsäure	8520	18750	9320	14205	8000	30100
Glutaminsäure	1136	1614	1096	1900	3350	17000
Alanin	710	6950	940	19000	817	37500
Phosphorylierte Zucker- und Glycerinsäure	95	3451	147	9800	523	23800
Nicht phosphorylierte Zucker	nicht be- stimmt	nicht be- stimmt	143	113	857	2726

Tabelle 3

Geigerstöße pro Minute der chromatographierten Hitzeextrakte aus 10 mm<sup>3</sup> *Chlorella*

### Zusammenfassung

Fasse ich zusammen, so ist durch die Festlegung der Bedingungen der Zucht und Messung nunmehr endgültig bewiesen, daß die Lichtenergie bei der Photosynthese fast vollkommen in chemische Energie umgewandelt werden kann. Es ist damit eine Arbeit abgeschlossen, die vor vielen Jahren in Berlin, in der Physikalischen Reichsanstalt, begonnen wurde. Nicht ohne Stolz dürfen wir es aussprechen, daß auf diesem Gebiet Deutschland, trotz Krieg und Zusammenbruch, die Führung behalten hat.

Das zweite Ergebnis ist der allgemeine physikalische Mechanismus der Photosynthese, das Zusammenspiel von Lichtenergie und Atmungsenergie und damit die Lösung des Quantenproblems der Photosynthese.

Das dritte Ergebnis ist die Funktion des Chlorophylls als stöchiometrischer chemischer Reaktionsteilnehmer der Photosynthese.

Es bleibt als letztes die spezielle Chemie der Photosynthese. Auf diesem noch unfertigen Gebiet ist das Hauptergebnis die labile Kohlensäure der *Chlorella*; damit zusammenhängend der Zerfall und Wiederaufbau der Glutaminsäure in der lebenden *Chlorella*; und damit zusammenhängend die wahrscheinliche Funktion der Aminosäuren, der Asparaginsäure und der Glutaminsäure, bei der Bindung und Reduktion der Kohlensäure.

## Anmerkungen

### 1. Quantenbedarf in den USA

In den Jahren 1939 bis 1947 wurde in verschiedenen Instituten der USA der Quantenbedarf der Photosynthese gemessen mit dem Ergebnis, daß *Chlorella* 12 bis 20 Quanten benötigt, um eine Molekel Sauerstoff zu entwickeln. Der gefundene Mittelwert war 16. Der Wert 12 wurde als der optimale Wert betrachtet. Einige Wenige, darunter *Dean Burk* und *van Niel*, opponierten, aber die Interpreten und Propagandisten der hohen Quantenzahlen, *James Franck* und *Eugene Rabinowitch*, behielten die Oberhand. „We know now that the high efficiency is only apparent and that the true efficiency is probably only a third of it, namely 12 quanta per molecule  $\text{CO}_2$  reduced“ (*J. Franck* und *H. Gaffron*, *Advances in Enzymology* 1, 200 [1941]). Die „*Photosynthetic Unit*“ in Urbana/Illinois, *Emerson* und *Rabinowitch*, blieben bis 1952 bei den hohen Quantenzahlen (*E. Rabinowitch* und *Ehrmantraut*, *Arch. Biochemistry* 38, 67 [1952]). Später, unter dem Einfluß der Dahlemer Arbeiten, gingen in den USA die Quantenzahlen herunter, sie nähern sich heute den Dahlemer Zahlen (*O. Warburg*, *Biochim. Biophys. Acta*, 18, 163 [1955]).

### 2. Lichtreaktion und Dunkelreaktion

Nach den Gleichungen der Licht- und Dunkelreaktion, der zeitlich gespaltenen Photosynthese, wird in der Lichtreaktion bereits die neue Kohlensäure wieder aufgenommen, so daß das Verhältnis  $\text{CO}_2/\text{O}_2$  in der Lichtreaktion gleich  $-1$  ist (obwohl diejenige Kohlensäure, aus der der Sauerstoff entwickelt ist, nicht diejenige Kohlensäure ist, die aufgenommen wird). Doch gilt dies nur für optimal gezüchtete Zellen, deren Quantenbedarf in der Bilanz 3 bis 4 ist. Andere Zellen, zum Beispiel am Südfenster gezüchtete Zellen, nehmen die Kohlensäure langsamer auf. Dann ist das Verhältnis  $\text{CO}_2/\text{O}_2$  in der Lichtreaktion nicht gleich  $-1$ , sondern liegt zwischen  $-1$  und 0, und die neue Kohlensäure wird erst in der Dunkelreaktion aufgenommen. Es sind also zwei Reaktionen der Kohlensäure zu unterscheiden, die Bindung der Kohlensäure und die Umwandlung der gebundenen Kohlensäure in den Photolyten. Im Fall der optimal gezüchteten Zellen sind diese beiden Reaktionen der Kohlensäure zeitlich vollständig getrennt, während die Sauerstoff-Entwicklung und die Bindung der Kohlensäure zeitlich zusammenfallen. Bei den weniger wirksamen Zellen sind die beiden Reaktionen der Kohlensäure zeitlich nicht getrennt, während Sauerstoff-Entwicklung und Kohlensäure-Bindung getrennt sind. Die Entwirrung dieser Verhältnisse hat viele Versuche gekostet.

### 3. Einheit der 2500 Chlorophyll-Molekeln

*Emerson* und *Arnold* (*R. Emerson* und *W. Arnold*, *J. General Physiology* 16, 191 [1932]) versuchten 1932, unsere Methoden der intermittierenden Belichtung (*O. Warburg*, *Biochem. Z.* 100, 230 [1919]; *O. Warburg* und *E. Negelein*, *Biochem. Z.* 202, 202 [1928] und 274, 64 [1929]!) irgendwie auf die Photosynthese anzuwenden. Zum Beispiel bestimmten sie mit sehr kurzen, sehr hellen Lichtblitzen und langen Dunkelperioden die maximale Sauerstoff-Menge, die in einem Lichtblitz entwickelt werden kann. Wurde diese Sauerstoff-Menge mit dem Chlorophyll-Gehalt der Zellen verglichen, so zeigte sich, daß 2500 Molekeln Chlorophyll eine Molekel Sauerstoff entwickeln können. Demgegenüber finden wir, ohne intermittierendes Licht, durch direkte Messung der Lichtreaktion bei gehemmter Dunkelreaktion, daß eine Molekel Chlorophyll eine Molekel Sauerstoff entwickeln kann. Es besteht also eine Diskrepanz von 3 Zehnerpotenzen, je nachdem man das Verhält-

nis Chlorophyll: Sauerstoff mit intermittierendem Licht oder direkt mißt. Wie jedoch *Dean Burk* gezeigt hat (Sci. Monthly 73, 213 [1951] und Federation Proceedings 12, 611 [1953]), war bei den Versuchen von *Emerson* und *Arnold* die Intensität der Lichtblitze einige Zehnerpotenzen zu niedrig, d. h. ganz unzureichend, um den Photolyten in der sehr kurzen Zeit des Lichtblitzes ( $\sim 10^{-5}$  sec) zu zersetzen.

#### 4. Ausstoß der Kohlensäure

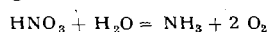
Nach *Emerson* und *Lewis* (*R. Emerson* und *C. M. Lewis*, Amer. J. Botany 26, 808 [1939] und 28, 789 [1941]) beginnt die Photosynthese mit einem Ausstoß von Kohlensäure. Diese merkwürdige Erscheinung wurde manometrisch mit der Zweigefäßmethode entdeckt, aber unter Nichtbeachtung der Hauptbedingung dieser Methode. Statt die beiden Gefäße gleichzeitig zu belichten, wurden sie in Abständen von 8 bis 24 h hintereinander belichtet. Natürlich entfiel damit die Hauptbedingung der Zweigefäßmethode, daß in den beiden ungleichen Gefäßen chemisch das Gleiche vor sich gehen muß. Mißt man, wie es heute vorgeschrieben ist, die Sauerstoff-Entwicklung für die beiden Gefäße gleichzeitig mit dem geteilten Lichtstrahl, so findet man zu Beginn der Belichtung niemals einen Ausstoß von Kohlensäure aus lebenden Zellen, sondern, entsprechend dem Sinn der Photosynthese, immer nur einen „Ausstoß“ von Sauerstoff.

#### 5. Die Versuche von Ruben und Kamen

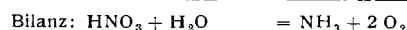
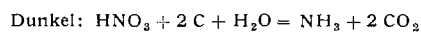
Wurde *Chlorella* in einer Bicarbonatlösung belichtet, deren Sauerstoff im Wasser, aber nicht in der Kohlensäure isotopisch markiert war, so zeigte sich, daß der entwickelte Sauerstoff markiert war. Die Schlußfolgerung von *Ruben* und *Kamen* (*S. Ruben* und *M. D. Kamen*, J. Amer. chem. Soc. 62, 3451 [1940]) war, daß das Licht primär Wasser, aber nicht Kohlensäure zersetzt. Offenbar wäre dieser Schluß nur dann richtig gewesen, wenn man den unwahrscheinlichen Beweis hätte erbringen können, daß im Licht nicht das Hydrat, sondern nur das Anhydrid der Kohlensäure reagiert.

#### 6. Hill-Reaktionen

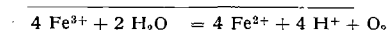
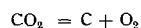
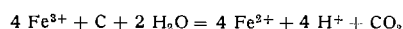
Suspendiert man *Chlorella* in Nitrat-Salpetersäure, so entwickelt sie — bei Abwesenheit von Kohlensäure — im Licht stundenlang Sauerstoff nach der Gleichung



eine Reaktion, die 1920 entdeckt wurde (*O. Warburg* und *E. Negelein*, Biochem. Z. 110, 66 [1920]). Der Mechanismus dieser Reaktion ist dahin aufgeklärt worden, daß die Salpetersäure in einer Dunkelreaktion Kohlenstoff zu Kohlensäure oxydiert, und daß dann im Licht die Spaltung der Kohlensäure in  $\text{C} + \text{O}_2$  erfolgt, wie bei der gewöhnlichen Photosynthese:



1955 fanden wir (*O. Warburg* und *G. Krippahl*, Z. Naturforsch. 10b, 301 [1955]), daß man hier die Salpetersäure durch Eisen(III)-cyanid ersetzen kann



Beide Reaktionen, mit lebender *Chlorella*, sehen in der Bilanz so aus, als ob hier Wasser durch Licht zersetzt werde und als ob das Oxydationsmittel nur als Wasserstoff-

Acceptor wirke, während in Wirklichkeit die Lichtreaktion die gewöhnliche Photosynthese ist.

Ersetzt man, in dem Versuch mit lebender *Chlorella*, die Salpetersäure oder das Eisen(III)-cyanid durch Chinon, so kann die Kohlensäure nicht an der Entwicklung des Sauerstoffs beteiligt sein, da Chinon die Spaltung der Kohlensäure vollständig hemmt. Ebenso wenig kann bei der Entwicklung von Sauerstoff aus den grünen Grana die Kohlensäure beteiligt sein, da belichtete Grana Kohlensäure nicht reduzieren können.

Man muß also entweder in den grünen Grana und in der intakten Zelle zwei verschiedene Mechanismen der photochemischen Sauerstoff-Entwicklung annehmen — was unwahrscheinlich ist — oder man muß versuchen, für die beiden Erscheinungen eine gemeinsame Erklärung zu finden: für die Wasserzersetzung mit intermediärer Photosynthese und für die Wasserzersetzung ohne intermediäre Photosynthese (*O. Warburg* und *G. Krippahl*, Svensk Kemisk Tidskrift 69, 143 [1957]).

#### 7. Die Versuche von F. W. Allen

(*F. W. Allen*, Arch. Biochemistry 55, 38 [1955]; *R. Hill* und *C. P. Whittingham*, New Phytologist 52, 133 [1953]):

Um zu prüfen, ob Photosynthese ohne Sauerstoff möglich ist, machte *Allen* auf Vorschlag von *James Franck* von der Tatsache Gebrauch, daß die Phosphoreszenz mancher Farbstoffe durch Spuren von Sauerstoff vermindert wird. Ein Strom von  $\text{CO}_2$ -haltigem Stickstoff wurde über erhitztes Kupfer geleitet, von da über Wasser, über eine *Chlorella*-Suspension, über flüssigen Stickstoff und schließlich über den Farbstoff Acriflavin, der an Silicagel adsorbiert war. *Allen* fand bei einem Sauerstoff-Druck von  $10^{-6}$  mm Hg noch merkliche Photosynthese, während die Manometrie im geschlossenen Gefäß, ohne jede Fehlermöglichkeit, zeigt, daß  $10^{-1}$  mm Hg der kritische Druck ist, unterhalb dessen Photosynthese der *Chlorella* nicht mehr nachweisbar ist. Woher kommt diese Diskrepanz von 5 Zehnerpotenzen?

Die Methode von *James Franck* muß empirisch geeicht werden, das heißt, diejenigen Sauerstoff-Drucke müssen analytisch bestimmt werden, die eine bestimmte Phosphoreszenz erzeugen. Es müssen also in einem schnell strömenden Gas Sauerstoff-Drucke von der Größenordnung  $10^{-6}$  mm Hg hergestellt, aufrecht erhalten und analytisch gemessen werden. Wer gewohnt ist, selbst zu experimentieren, weiß, daß dies eine fast unlösbare Aufgabe ist. Jedenfalls ist die analytische Bestimmung von Sauerstoff-Spuren die Hauptsache bei der *Franckschen* Methode; und da sich *Allen* über diesen Punkt ausschweigt, wird man hier den Fehler suchen. Die Eichung ist offenbar um 5 Zehnerpotenzen falsch gewesen.

Andererseits stimmen Versuche von *Robert Hill* und *C. P. Whittingham* (New Phytologist, 52, 133 [1953]) sehr gut zu unseren Ergebnissen. *Hill* und *Whittingham* gaben zu einer *Chlorella*-Suspension reduziertes Haemoglobin und bestimmten die Sauerstoff-Entwicklung bei Belichtung durch optische Messung des entstehenden Oxy-haemoglobins. Sie fanden, daß bei einem Sauerstoff-Druck von etwa 2 mm Hg die Photosynthese bereits beginnt, abzusinken.

#### 8. Die Versuche von Allan Brown über die „Lichtatmung“

(*Allan H. Brown*, Amer. J. Botany 40, 719 [1953]):

Wenn bei der Photosynthese unter normalen Bedingungen Lichtreaktion und Dunkelreaktion sich überlagern, so wird  $\frac{2}{3}$  des im Licht entstehenden Sauerstoffs so schnell wieder absorbiert, daß man sich den Sauerstoff oszillierend

denken kann zwischen dem freien und an Kohlenstoff gebundenen Zustand. Ist nun der molekulare Sauerstoff, der *Chlorella* zugeführt wird, isotopisch markiert, während die Kohlensäure nicht markiert ist, so kann man nicht erwarten, daß im Licht mehr markierter Sauerstoff verbraucht wird als im Dunkeln, da im Licht aus räumlichen Gründen der in den Zellen entstehende nicht markierte Sauerstoff schneller verbraucht werden wird als der von außen zuströmende markierte Sauerstoff. Tatsächlich fand *Brown* im Licht keine Zunahme der markierten Atmung oder sogar eine Abnahme der markierten Atmung, das heißt, es verbrauchte dann nicht nur die Lichtatmung, sondern auch die Dunkelatmung bevorzugt den in der Zelle entstehenden, also nicht markierten Sauerstoff. Dies ist ein schönes Beispiel von „*Isotope Discrimination*“.

Auch sonst ist versucht worden, die Lichtatmung während der Belichtung zu messen, zum Beispiel von *J. W. Weigl, P. M. Warrington* und *M. Calvin* (*J. Amer. chem. Soc.* 73, 5058 [1951]; vgl. auch diese Ztschr. 68, 253 [1956]), die grüne Zellen in markierter Kohlensäure belichteten und erwarteten, daß im Licht in verstärktem Maße nicht markierte Kohlensäure abgegeben werde. Sie fanden keinen Zuwachs an nicht markierter Kohlensäure, ganz in Übereinstimmung mit unseren Gleichungen, aus denen hervorgeht, daß die Lichtatmung markiert sein muß, wenn die Kohlensäure markiert ist.

Tatsächlich kann die Lichtatmung nur so gemessen werden, wie sie entdeckt worden ist: indem man sie zeitlich von der Sauerstoff-Entwicklung trennt.

Eingegangen am 26. September 1957 [A 831]

## Analytisch-technische Untersuchungen

# Eis-Zonenschmelzen

## Neue Methode der Anreicherung geringster Substanzmengen aus wäßriger Lösung

Von Dr. H. SCHILDKNECHT und Dipl.-Chem. A. MANNL

Aus dem Institut für organische Chemie der Universität Erlangen

Das bekannte Verfahren der Zonenschmelze anorganischer oder auch organischer fester Substanzen, welches zur Abscheidung bzw. Anreicherung geringer Nebenbestandteile an einem Ende des Untersuchungsmaterials verwendet wird, wurde sinngemäß auf Flüssigkeiten übertragen. Bisher liegen Untersuchungen an Benzol und Wasser vor. Die Flüssigkeiten werden zuerst gefroren und dann wird das entstandene „Eis“ in wandernden Zonen aufgeschmolzen. Die mit einer geeigneten Apparatur erzielten Anreicherungen von Ascorbinsäure, Chinonen, Aldehyden, Enzymen, Bakterien, Bakteriophagen und Plankton in wäßriger Phase bzw. von Thiophen in Benzol werden mitgeteilt.

### Einleitung

Schon sehr alt ist die Methode, wäßrige Lösungen durch Ausfrieren des Wassers einzuengen; dabei wird das überstehende Konzentrat von den ausgeschiedenen Eiskristallen durch Absaugen oder auch Zentrifugieren getrennt. Eleganter kann man – nach einer neuen Mitteilung zu schließen<sup>1)</sup> – so verfahren, daß man die Ausgangslösung zuerst ganz einfriert und dann mittels Hochfrequenz partiell wieder auftaut. Die unvermeidbaren Verluste dieser Verfahrensweisen, die u. a. durch Anhaften der konzentrierten Lösungen an die Eiskristalle entstehen können, sind aber nur dann unbedeutend, wenn man über genügend Ausgangsmaterial verfügen kann und wenn eine starke Anreicherung aus sehr verdünnten Lösungen nicht nötig ist.

Diese Nachteile zu umgehen und gleichzeitig die Vorteile der erwähnten Verfahren zu wahren, war unser Ziel bei der Entwicklung einer neuen Methode. Sie mußte demnach dem gleichen Prinzip folgen, d. h. durch Ausfrieren von Lösungsmittel die Anreicherung flüchtiger und hitzeempfindlicher Substanzen ermöglichen und sollte gleichzeitig kontinuierlich arbeiten, um verlustlos auch noch wenige Kubikzentimeter einer stark verdünnten Lösung aufarbeiten zu können. Wir gingen von der Überlegung aus, daß das zur Darstellung hochreiner anorganischer<sup>2)</sup> und organi-

scher<sup>3)</sup> Substanzen erfolgreich angewandte Zonenschmelzen sich auch umgekehrt zur Anreicherung kleinster Mengen einem Trägermaterial beigemengter Verbindungen eignen mußte. Auf das in der Biochemie besonders wichtige wäßrige System übertragen hieß das also, durch einen künstlich hergestellten Eisbarren, der die anzureichernde Verbindung gleichmäßig verteilt enthält, Schmelzzonen in der schon mehrmals beschriebenen Technik<sup>2, 3)</sup> hindurchwandern zu lassen. Die Beimengungen müssen dann in dem zuletzt erstarrenden Ende gelöst, oder wenn die Löslichkeit überschritten wurde, auch suspendiert zu finden sein. Sie können dann aus dieser, je nach Schmelzzonenbreite und Form des Schiffchens mehr oder minder stark konzentrierten Lösung, durch Gefriertrocknung in Substanz isoliert werden. Somit stellt das Eis-Zonenschmelzen eine wertvolle Ergänzung zur Gefriertrocknung dar, indem die Ausgangslösung vor dem Gefriertrocknen zuerst auf ein kleines Volumen eingengt wird. Damit wird vermieden, daß sich geringste Mengen wertvoller Substanzen nach dem Gefriertrocknen auf ein großes Volumen verteilen<sup>4)</sup> und u. U. schon vorher ganz oder teilweise beim Sublimieren des Eises verlustig gehen.

<sup>1)</sup> H. Röck, *Naturwissenschaften* 41, 425 [1954]. G. Hesse u. H. Schildknecht, diese Ztschr. 68, 641 [1956]. H. Schildknecht, *Z. Naturforsch.* 12b, 23 [1957].

<sup>2)</sup> F. Patat u. J. Hartmann, diese Ztschr. 69, 197 [1957].

<sup>3)</sup> Herrn Mechanikermeister G. Weninger danken wir auch an dieser Stelle für die Herstellung der Apparatur; Dipl.-Chem. R. Nachtrab für die leihweise Überlassung eines Kühlaggregates.

<sup>1)</sup> Chem. Engng. News 34, 6426 [1956].

<sup>2)</sup> J. W. G. Pfann, *J. Metals* 1, 747, 861 [1952].